

2016 年度修士論文要旨

上皮構造形成におけるアフアディンの役割

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 鈴木研究室 柳橋 遼

【研究目的】上皮組織はその特徴として頂端側と基底側という極性を持ち、頂端側から密着結合、接着結合、デスモソームなどの細胞間接着構造体が存在することが知られている。中でも接着結合はカドヘリンとネクチンからなり、上皮組織の形成において特に重要であると考えられている。カドヘリンは Ca^{2+} 依存性の膜貫通タンパク質で、細胞外領域ではカドヘリン同士が結合し、細胞内領域では p120-カテニン、PLEKHA7、Nezha を介して微小管と、また、 β -カテニン、 α -カテニンを介してアクチンフィラメントと結合している。一方、ネクチンは細胞外領域でネクチン同士が結合し、細胞内領域ではアフアディンを介してアクチンフィラメントと、また、アフアディンは PLEKHA7、Nezha を介して微小管と結合している。最近の研究でアフアディンのノックアウトは上皮構造に影響を与えないということが報告された。しかしながら、アフアディンはカドヘリンと同じように微小管やアクチンフィラメントと結合している上に、ZO-1、 α -カテニン、PLEKHA7 などの様々な細胞間接着構成タンパク質との相互作用が確認されていることから、上皮構造形成に何らかの役割を担っていることが考えられる。そこで、本研究は上皮構造形成におけるアフアディンの機能を解明することを目的とした。

【実験方法】遺伝子のノックアウトは CRISPR/Cas9 システムを用いてスクリーニングを行った。シストの形成はコラーゲンゲル及びマトリゲルを用いて行った。シストの免疫蛍光染色は 2% PFA で固定し、ゼラチンとサポニンの混合液をブロッキングバッファーとして用い、一次抗体、二次抗体をそれぞれ反応させた後、封入を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

【実験結果と考察】アフアディンノックアウト細胞はシストを正常に形成しており、細胞間接着構造体にも影響は見られなかった。しかしながら、アフアディンに加え p120-カテニンや ZO-1 などの接着タンパク質をノックアウトしたところ、シストに異常が現れ、接着構造体にも影響があった。これらの細胞で再発現の実験を行ったところ、正常なシストを形成するようになった。アフアディンはそれぞれ様々なタンパク質との結合ドメインを持っており、複合体をつくることによって上皮構造を維持していると考えられる。したがって、これらの結果からそのうちの一つをノックアウトしても、互いに補い合うことで上皮構造に影響を与えないが、複数ノックアウトすることによって複合体が破壊され、上皮構造の形成、維持ができなくなることが考えられる。